Qubit® 3.0 Fluorometer
アプリケーションノート集

目　次

蛍光ベースの定量法と
UV ベースの吸光度測定法との比較

Qubit® Fluorometerによる定量 vs.分光光度計による定量

核酸の検出と定量は、多くの生物学的研究で必要不可欠です。これまで DNA や RNA は、260 nm の波長の吸収度を測定する分光光度計を使用して定量されてきました。この分析法は、広く一般的に利用されていますが、信頼性や正確さに劣る場合もあります [1–4]。UV 吸光度測定法は選択的ではなく、DNA、RNA、またはタンパク質が混合されたサンプルでは、これらを区別してそれぞれの定量結果を表示することはできません。また、その測定値は他の混入物（遊離ヌクレオチド、塩、有機化合物など）や塩基組成の差異によって容易に影響されます。さらに、分光光度計の感度は不十分であることが多いため、これが低濃度の DNA や RNA を定量する妨げとなります。

これらの欠点が考慮され、核酸の定量には蛍光色素を使用する方法が一般的になってきています [5–8]。蛍光ベースの定量は、より高感度で、多くは目的の核酸に特異的です。弊社では、Qubit® Fluorometer と NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer の 2 つの定量法について比較しました。その結果、Qubit® による蛍光定量では、NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer による UV 吸光度測定に比べて、より選択性が高く、高感度かつ高精度な核酸定量が可能であることが確認されました。しかしながら、Qubit® Fluorometer と NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer は、組み合わせて DNA または RNA の濃度測定に使用すると、Qubit® Fluorometer で正確な濃度測定、そして NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer で夾雑物の存在の確認を行うことができます。

表1. Qubit® Fluorometerを使用したQubit® Assay

キット	サンプルの初期濃度範囲
Qubit® dsDNA HS assay	10 pg/μL–100 ng/μL
Qubit® dsDNA BR assay	100 pg/μL–1μg/μL
Qubit® ssDNA assay	50 pg/μL–200 ng/μL
Qubit® RNA assay	250 pg/μL–100 ng/μL
Qubit® RNA BR assay	1 ng/μL–1μg/μL
Qubit® protein assay	12.5μg/mL–5 mg/mL

Qubit® 蛍光定量の概要

Qubit® 蛍光定量は、ユーザーフレンドリーな蛍光光度計と高感度な蛍光ベースのタンパク質定量アッセイを組み合わせて行います。Qubit® Fluorometer は、DNA、RNA、およびタンパク質のルーチンな定量用の Qubit® Assay Kit とシームレスに連動するように設計された小さく、リーズナブルな装置です（表 1）。すべての設定と計算が可能です。本システムは、シンプルで迅速、かつ操作が簡便でありながら、一貫性のある高精度な測定結果を得られるため、信頼性を持ってその後の解析に進むことができます。それぞれの Qubit® Assay Kit による定量は、単一のターゲットに高特異的で、他の吸光度ベースの測定よりも高感度です。わずか 1 ～ 20μL のサンプル量しか必要としないため、より少量サンプルの定量への使用、より多くのサンプルの解析が可能です。
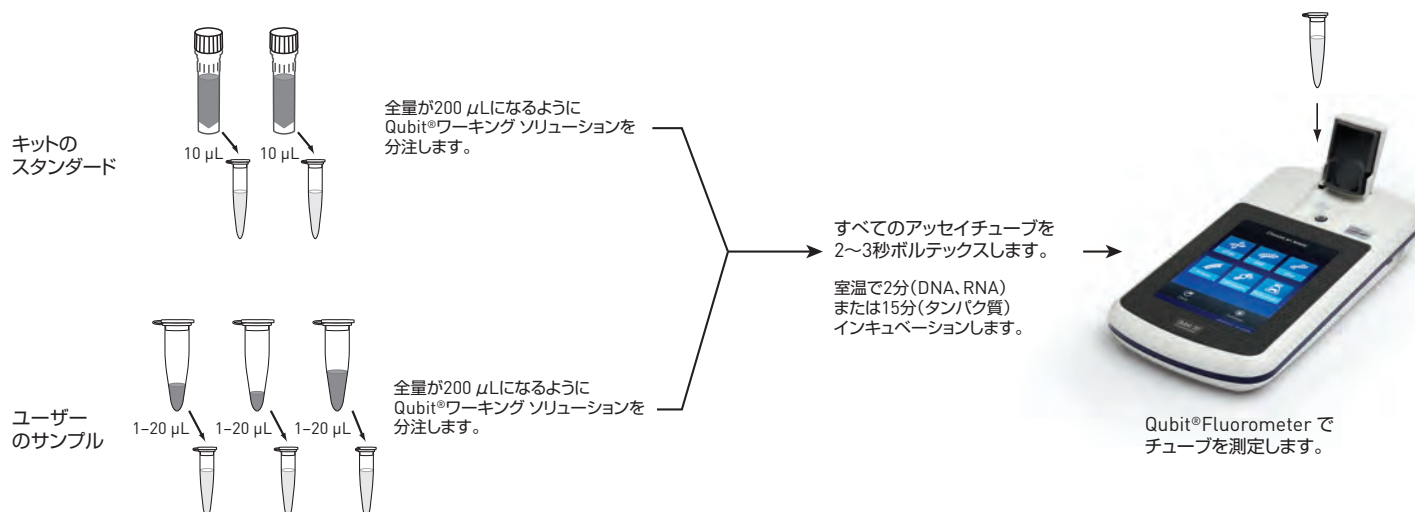
図1. Qubit® 2.0 Fluorometerを使用したQubit® Assayのワークフロー

Qubit® アッセイは、Qubit® Fluorometer と組み合わせて使用するように設計されており、すべてのアッセイに同じ標準プロトコールが使用されます。シンプルな mix-and-read 形式を採用しており、DNA および RNA アッセイに要するインキュベーション時間はわずか 2 分です(図 1)。

DNA または RNA に対する選択性の比較

核酸濃度測定における Qubit® 蛍光定量法と UV 吸光度測定法の最も重要な違いは、Qubit® アッセイの持つ目的の分子に非常に特異的であるという選択性で、UV 吸光度測定法に比べてはるかに正確な情報が得られます。UV 分析を使用すると、DNA と RNA を両方含むサンプルでは、これらを区別してそれぞれの定量結果を表示することはできません。これに対し、Qubit® 蛍光定量法では、このようなサンプルにおいて、DNA と RNA の両方を正確に測定することができます(図 2)。この実験では、Qubit® dsDNA BR Assay Kit を使用したところ、RNA が DNA と同量含まれるサンプルにおいて DNA 濃度は実際の濃度の 2%以内の誤差範囲で測定されました。さらに、RNA が DNA の 10 倍含まれるサンプルにおいては、DNA 濃度が実際の濃度よりわずか 7%高く測定されました。このように DNA と RNA が両方含まれるサンプルでは、NanoDrop® Spectrophotometer を使用した UV 吸光度測定で DNA 濃度を正確に測定することはできず、その後の解析においてエラーが増加する可能性があります。
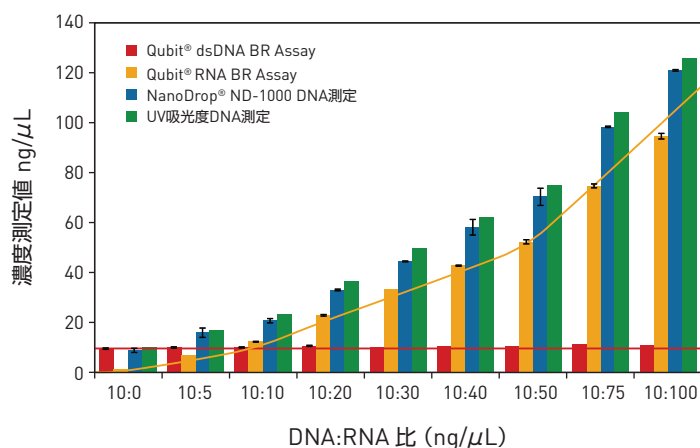
図2. Qubit® Assayの選択性に関するUV分光光度計との比較
Qubit® dsDNA BRおよびQubit® RNA BRを使用し、キットのプロトコールに従い、λ DNA (10ng/µL) およびさまざまな濃度の*E.coli*リボソームRNA (0〜100 ng/µL) が含まれるサンプルを3つずつQubit® Fluorometerで解析した。その後、同じサンプルをNanoDrop® ND-1000 Spectrophotometerを使用して3つずつ解析し、さらにPerkinElmer® Lambda 35 Spectrophotometerを使用して1つずつ解析した。表示されている濃度は、Qubit®アッセイチューブで希釈する前の初期サンプルに含まれるDNAとRNAの濃度を示す。赤とオレンジのラインは、それぞれ初期サンプルに含まれる実際のDNAとRNAの濃度を示す。核酸の実際の濃度は、高純度のDNAとRNA濃縮溶液をそれぞれ希釈し、Perkin Elmer® Lambda 35 Spectrophotometer で 260nm の光学濃度が 1.0になるよう設定した。その後、ストック溶液の濃度は、すべて希釈時に計算して使用した。UV分光分析を使用すると、DNAとRNAを両方含むサンプルの測定において、DNAとRNAを区別して定量することができないため、混合された状態の定量結果が表示される。
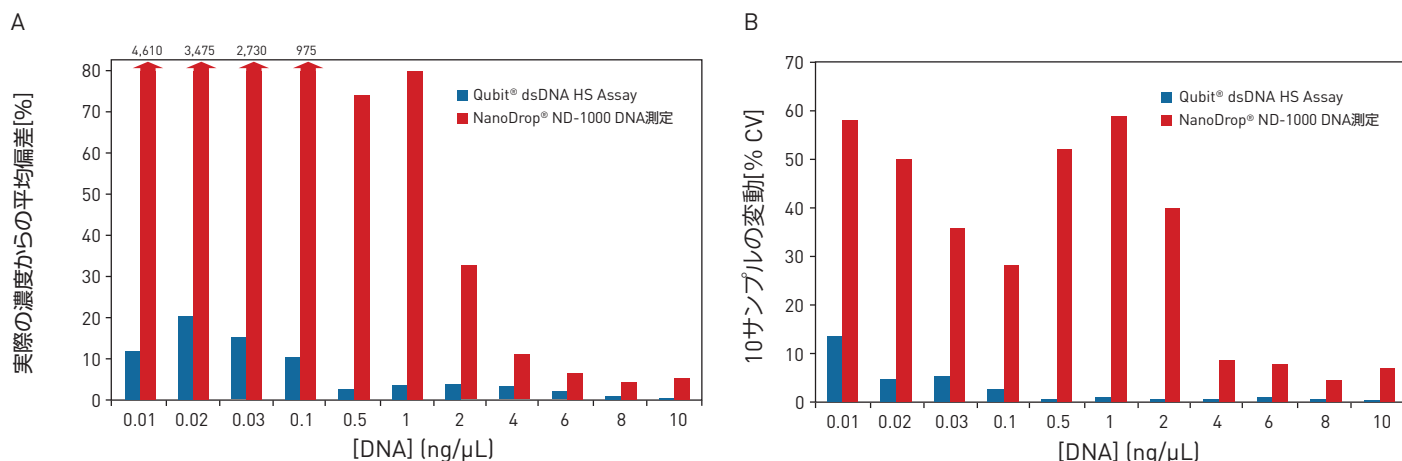
図3. Qubit® Fluorometerによる蛍光定量の正確度と精密度
Qubit® dsDNA HS Assayを使用し、標準的なキットのプロトコールに従い、濃度0.01〜10 ng/μLのλ DNA サンプルを 10サンプルずつQubit® Fluorometer で解析した。次に同じ濃度のDNAについてNanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer を使用して10サンプルずつ解析し、双方の結果の正確度（A）と精度（B）を比較した。正確度は実際の濃度からの平均偏差として定義した。表示されている濃度は、Qubit®アッセイチューブで希釈する前の初期サンプルに含まれるDNA濃度を示す。

低濃度での正確度と精度の比較

Qubit® 蛍光定量法は、低濃度域の測定において、NanoDrop® Spectrophotometer などを使用する UV 吸光度測定法よりも正確かつ精密な結果が得られるように設計されています。Qubit® dsDNA HS Assay Kit を使用した Qubit® Fluorometer による定量では、サンプル中の DNA 濃度が最低 10 pg/μL までは、実際の濃度の 12%以内の誤差範囲で測定されました（図 3A）。これに対し、NanoDrop® Spectrophotometer による同じサンプルの定量では 46 倍高く測定されました。10 ng/μL の DNA を含むサンプルの濃度は、Qubit® Fluorometer を用いた場合は実際の濃度の 1%以内、NanoDrop® Spectrophotometer を用いた場合は実際の濃度の 5%以内の正確さで読み取られました（NanoDrop® Spectrophotometer による定量下限は 2ng/μL と報告されています）。また、Qubit® Fluorometer による定量では、DNA 濃度が少なくとも 0.5 ng/μL 以上のサンプルすべてにおいて 10 サンプルの変動（% CV）は 1%以下でした（図 3B）。NanoDrop® Spectrophotometer による定量では、DNA 濃度が 4ng/μL 以上のサンプルにおいてのみ 9%未満の CV 値が得られました。

図4. Qubit® AssayとNanoDrop® Spectrophotometerを使用したUV吸光度測定法のサンプルの濃度範囲の比較

感度とレンジの比較

Qubit® Fluorometer を使用する Qubit® Assay は、UV 吸光度測定法よりも高感度であり、1〜20μL の少量サンプルの測定が可能なことからアッセイの有効範囲は広がる可能性があります（図 4）。Qubit® dsDNA HS Assay と Qubit® dsDNA BR Assay は、合わせて 10 pg/μL〜1μg/μL DNA のサンプル濃度範囲をカバーしています。同様に、Qubit® RNA Assay と Qubit® RNA BR Assay は、合わせて 250 pg/μL〜1μg/μL のサンプル濃度範囲をカバーしています。NanoDrop® Spectrophotometer は、2 ng/μL〜15μg/μL のサンプル濃度範囲をカバーしていることが製造元より報告されています。

夾雑物存在下における検出能

NanoDrop® Spectrophotometer のフルスペクトル吸光度分析では、夾雑物の存在を示すピークが検出されることがあります。これにより、下流の解析に悪影響を及ぼす可能性のある夾雑物の存在に関する有益な情報が得ることができます。

参考文献

1. Glasel JA (1995) *Biotechniques* 18:62–63.
2. Huberman JA (1995) *Biotechniques* 18:636.
3. Manchester KL (1995) *Biotechniques* 19:208–210.
4. Manchester KL (1996) *Biotechniques* 20:968–970.
5. Singer VL, Jones LJ, Yue ST et al. (1997) *Anal Biochem* 249:228–238.
6. Jones LJ, Yue ST, Cheung CY et al. (1998) *Anal Biochem* 265:368–374.
7. LePecq JB (1966) *Anal Biochem* 17:100–107.
8. Kapuscinski J (1995) *Biotech Histochem* 70:220–233.

Qubit® Fluorometerを使用したQubit® DNA/RNAアッセイにおけるグリコーゲンとGlycoBlue™試薬の使用

Glycogen(分岐構造を持つ糖鎖;製品番号10814010)とGlycoBlue™試薬(青色色素と共有結合しているグリコーゲン;製品番号AM9515)は、余分な核酸をサンプルに加えることなく核酸の沈殿を促進するために一般的に使用される試薬です。本試験は、グリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬がQubit®キットを使用した核酸定量の精度に影響を与えるかどうかを評価するために実施しました。

概要

本試験では、Qubit® DNA/RNA定量アッセイにおいて核酸サンプルに高濃度のグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬が含まれる場合、正確に核酸定量を行えるかどうかについて評価しました。500 ng/µLのグリコーゲン(アッセイチューブ中25 ng/µL)が含まれる核酸サンプルは、Qubit® dsDNA HS、Qubit® dsDNA BR、Qubit® RNA BR、およびQubit® RNA HSの4つのアッセイすべてで正確に定量されました(コントロールの5%以内)。同様に、500 ng/µLのGlycoBlue™試薬(アッセイチューブ中25 ng/µL)が含まれる核酸サンプルは、Qubit® dsDNA BR、Qubit® dsDNA HS、およびQubit® RNA BRの3つのアッセイで正確に定量されました。しかしながら、Qubit® RNA HSアッセイでは、GlycoBlue™試薬が100 ng/µL(アッセイチューブ中5 ng/µL)以下の濃度のときにのみ正確に定量されました。以上より、試験を行ったQubit® DNA/RNAアッセイは全てにおいて、DNAまたはRNAサンプルにグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬が含まれる場合、製造元が推奨する上記の濃度での定量が可能であることが示されました。試験を行った濃度、製造元の推奨濃度、および各アッセイの結果を表1にまとめました。

表1. 本試験で使用した添加物の濃度

添加物	推奨濃度(アッセイチューブで希釈する前のサンプル濃度)*	試験を行った濃度(アッセイチューブで希釈する前のサンプル濃度)†	各Qubit®アッセイにおける許容濃度(アッセイチューブ濃度)§
グリコーゲン	200–400 ng /µL (アッセイチューブ濃度10–20 ng/µL **)	500 ng /µL (アッセイチューブ濃度25 ng/µL **)	dsDNA HS: 25 ng/µL dsDNA BR: 25 ng/µL RNA BR: 25 ng/µL RNA HS: 25 ng/µL
GlycoBlue™試薬	50 ng /µL (アッセイチューブ濃度2.5 ng/µL **)	50–500 ng /µL (アッセイチューブ濃度2.5–25 ng/µL **)	dsDNA HS: 25 ng/µL dsDNA BR: 25 ng/µL RNA BR: 25 ng/µL RNA HS: 5 ng/µL

* 製品付属の取扱説明書に記載されている製造元による推奨濃度。

† 本試験で評価を行った濃度。

§アッセイ用に20倍希釈した終濃度。

** 核酸サンプルはアッセイ用に20倍希釈。10µLの核酸サンプルをアッセイチューブ中のQubit®試薬に添加。

アッセイ方法および結果

Qubit® dsDNA HS アッセイ

アッセイのコアレンジ：1 ～ 500 ng/mL の二本鎖 DNA
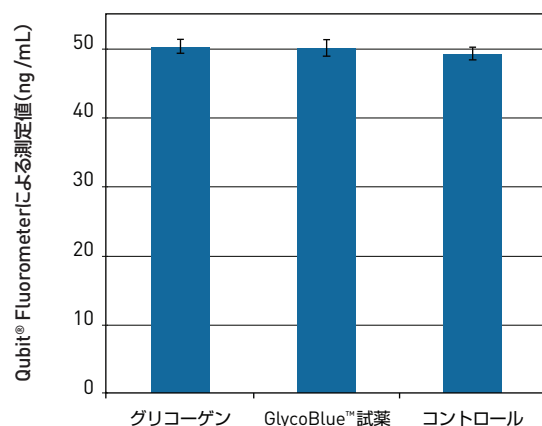
図1.25ng/μLのグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるDNAサンプルとDNAのみが含まれるサンプルのQubit® dsDNA HSアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のDNA濃度は50ng/mL（Qubit® dsDNA HSアッセイの推奨測定範囲の下限付近）。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各3サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。
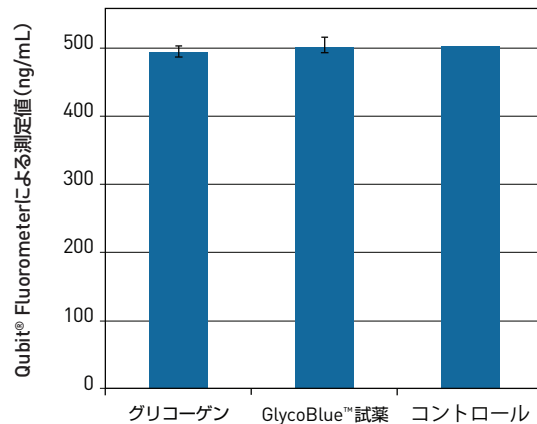
図2. 25ng/μLのグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるDNAサンプルとDNAのみが含まれるサンプルのQubit® dsDNA HSアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のDNA濃度は500ng/mL（Qubit®dsDNA HSアッセイの推奨測定範囲の上限付近）。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各3サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。

Qubit® dsDNA BR アッセイ

アッセイのコアレンジ：0.01 ～ 5μg/mL の二本鎖 DNA
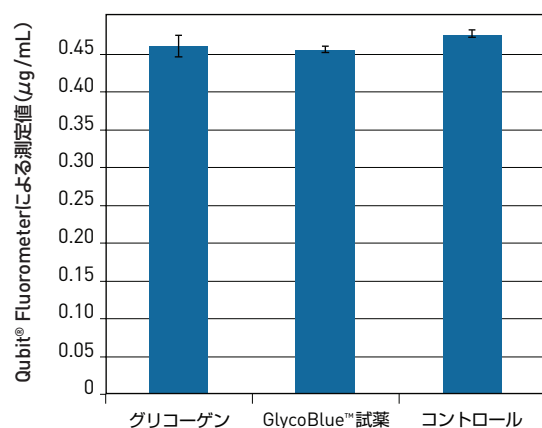
図3. 25ng/μLのグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるDNAサンプルとDNAのみが含まれるサンプルのQubit® dsDNA BRアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のDNA濃度は0.5μg/mL（Qubit® dsDNA BRアッセイの推奨測定範囲の下限付近）。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各2～3サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。
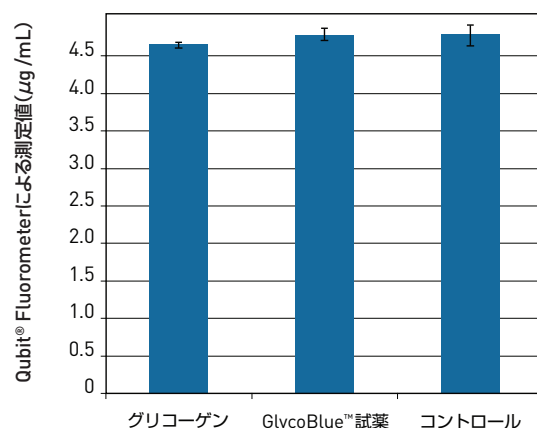
図4. 25ng/μLのグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるDNAサンプルとDNAのみが含まれるサンプルのQubit® dsDNA BRアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のDNA濃度は5μg/mL（Qubit® dsDNA BRアッセイの推奨測定範囲の上限付近）。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各3サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。

Qubit® RNA BR アッセイ

アッセイのコアレンジ : 0.1 ～ 5μg/mL の RNA
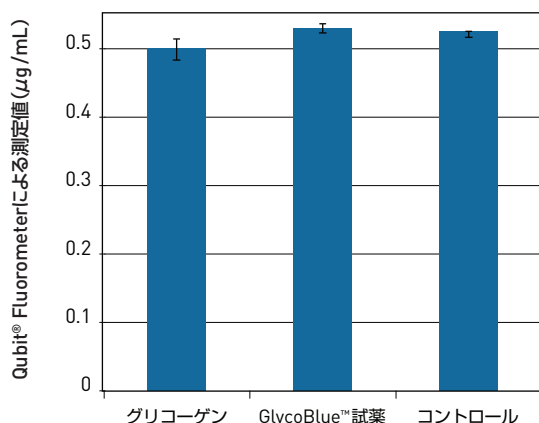
図5. 25 ng/μLのグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるRNAサンプルとRNAのみが含まれるサンプルのQubit® RNA BRアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のRNA濃度は0.5μg/mL（Qubit® RNA BRアッセイの推奨測定範囲の下限付近）。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各3サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。
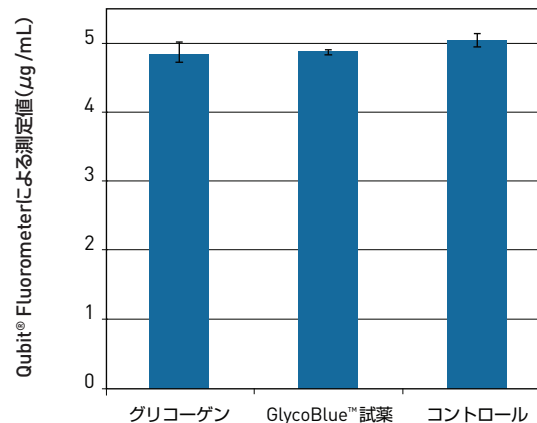
図6. 25 ng/μLのグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるRNAサンプルとRNAのみが含まれるサンプルのQubit® RNA BRアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のRNA濃度は5μg/mL（Qubit® RNA BRアッセイの推奨測定範囲の上限付近）。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各3サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。

Qubit® RNA HS アッセイ

アッセイのコアレンジ : 25 ～ 500 ng/mL の RNA
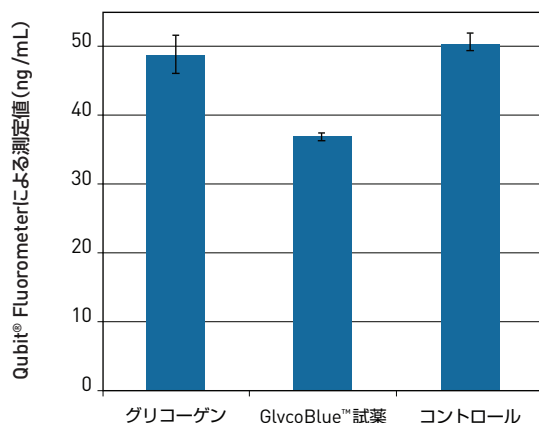
図7. 25 ng/μLのグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるRNAサンプルとRNAのみが含まれるサンプルのQubit® RNA HSアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のRNA濃度は50ng/mL（Qubit® RNA HSアッセイの推奨測定範囲の下限付近）。25ng/μLのGlycoBlue™試薬が含まれるRNAサンプルでは、コントロールの5%以内の測定結果が得られなかった。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各3サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。
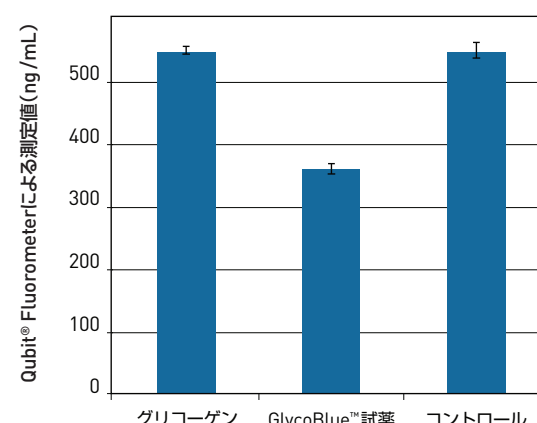
図8. 25 ng/μLのグリコーゲンまたはGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるRNAサンプルとRNAのみが含まれるサンプルのQubit® RNA HSアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のRNA濃度は500 ng/mL（Qubit® RNA HSアッセイの推奨測定範囲の上限付近）。25ng/μLのGlycoBlue™試薬が含まれるRNAサンプルでは、コントロールの5%以内の測定結果が得られなかった。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各3サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。

Qubit® RNA HS アッセイ

アッセイのコアレンジ : 25 ～ 500 ng/mL の RNA
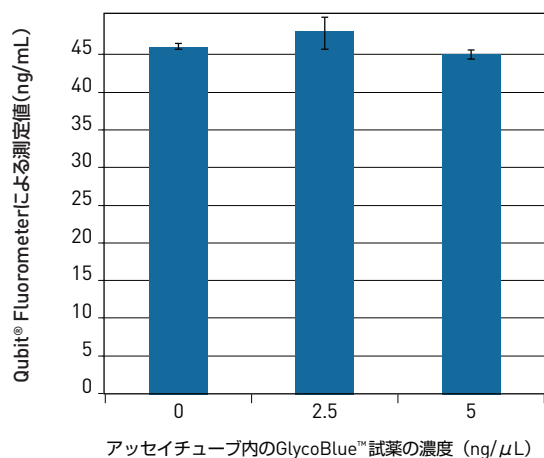
図9. 0～5 ng/μLのGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるRNAサンプルとRNAのみが含まれるサンプルのQubit® RNA HSアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のRNA濃度は50ng/mL（Qubit® RNA HSアッセイの推奨測定範囲の下限付近）。0～5ng/μLのGlycoBlue™試薬が含まれるRNAサンプルでは、コントロールの5%以内の測定結果が得られた。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各2サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。
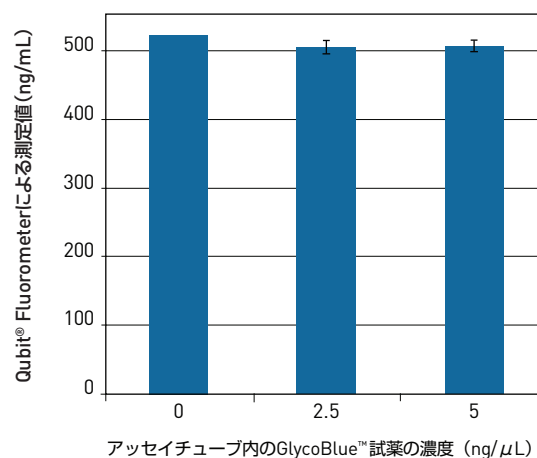
図10. 0～5 ng/μLのGlycoBlue™試薬（アッセイチューブ濃度）が含まれるRNAサンプルとRNAのみが含まれるサンプルのQubit® RNA HSアッセイ測定結果の比較

アッセイチューブ内のRNA濃度は500 ng/mL（Qubit® RNA HSアッセイの推奨測定範囲の上限付近）。0～5 ng/μLのGlycoBlue™試薬が含まれるRNAサンプルでは、コントロールの5%以内の測定結果が得られた。アッセイチューブに含まれるサンプル量は10μL～15μLで、各2サンプルずつ測定した平均値を結果として表示。

高精度かつ高感度なタンパク質の定量

Qubit® Fluorometerを使用したQubit® Protein Assayと他の既存のタンパク質アッセイとの比較

タンパク質は、生物学的プロセスにおいて広い範囲で基本的な役割を果たしているだけでなく、バイオテクノロジーおよび製薬業界において商業的にも重要であるため、その検出と定量は多くの生物学的研究で必要不可欠です。

現在、数種の吸光度ベースおよび蛍光ベースのタンパク質アッセイ法が汎用されていますが、それぞれの分析法に、タンパク質間差、夾雑物の影響、時間の制約、精度、感度、および腐食剤や有害薬剤の必要性に関する欠点があります。弊社では、4つの一般的なタンパク質アッセイについて、タンパク質間の測定値の変動、正確性、精度、精密度、および感度を比較しました。その結果、Qubit® Fluorometer を使用した Qubit® Protein Assay は、他の一般的なアッセイよりもタンパク質の種類による測定値差が小さく、迅速な定量、正確、精密、かつ高感度な測定が可能であることが示されました。

Qubit® 定量プラットフォーム：迅速で操作が簡単

Qubit® 定量プラットフォームは、ユーザーフレンドリーな蛍光光度計と高感度な蛍光ベースのタンパク質定量アッセイの組み合わせで構成されます。Qubit® Fluorometer は、タンパク質、DNA、および RNA のルーチンな定量用の Qubit® Assay Kit とシームレスに連動するように設計された小さく、リーズナブルな装置です（図 1）。すべての設定と計算が可能です。本システムは、シンプルで迅速、かつ操作が簡便でありながら、一貫性のある高精度な測定結果が得られるため、信頼性を持ってその後の解析に進むことができます。それぞれの Qubit® Assay Kit による定量は、単一のターゲットに高特異的で、吸光度ベースの測定よりも高感度です。わずか 1 ～ 20μL のサンプル量しか必要とせず、またすべてのアッセイ試薬は室温で保存できるため、試薬を解凍する必要もありません。
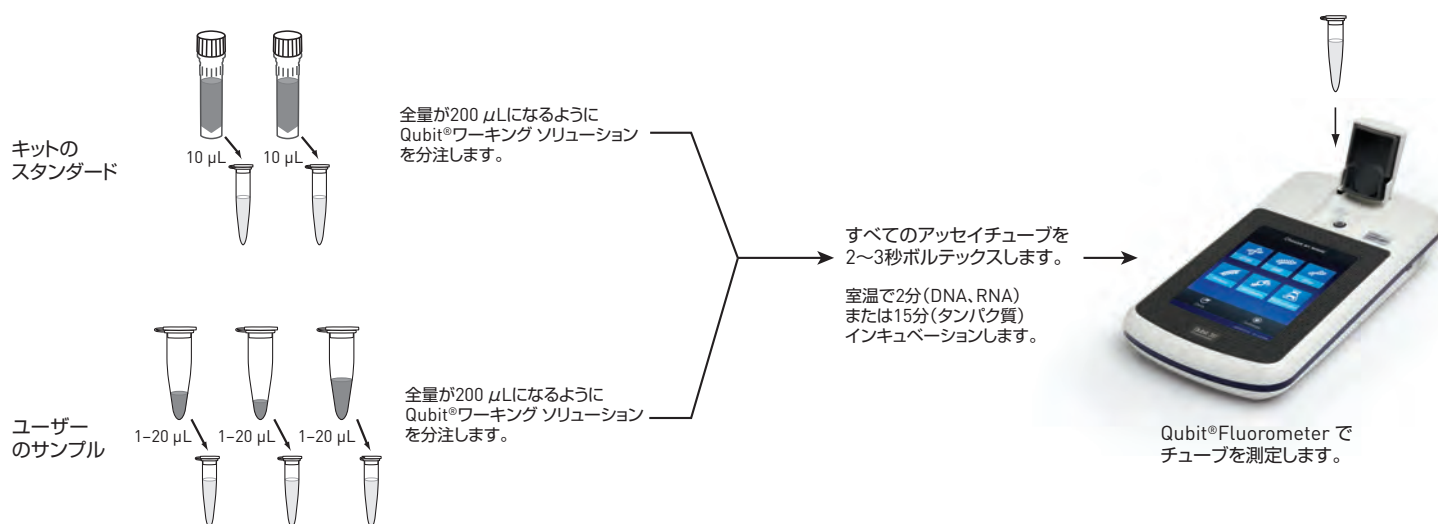
図1. Qubit® Fluorometerを使用したQubit® Protein Assayのワークフロー

Qubit® Protein Assay、正確、精密、高感度

Qubit® Fluorometer を使用した Qubit® Protein Assay について、Bio-Rad® Quick Start™ Bradford Protein Assay、Pierce® BCA Protein Assay、および Pierce® Modified Lowry Protein Assay の 3 つの一般的なタンパク質アッセイと比較しました(図 2)。Bradford 法(Coomassie™ Brilliant Blue 使用)[1] では、タンパク質間で測定値に大きな変動がみられました(図 2B)。BCA(ビシンコニン酸)法などの分光光度計による測定 [2] では、正確な時間での各ステップの操作が必要とされ、還元剤存在下での定量が困難であり、また本試験でもみられたようにリゾチーム濃度が高めに検出されることがよくあります(図 2C)。Lowry 法 [3](図 2D)は、時間のかかるマルチステップ手順を必要とし、界面活性剤、糖、および還元剤存在下での定量が困難とされます。Qubit® Protein Assay では、タンパク質間差が小さく、正確度および精密度に優れ、0.025 mg/mL 以下の低濃度のストックサンプルにおいても高感度な測定結果が得られました(図 2A)。

Qubit® Protein Assay は、還元剤、核酸、遊離アミノ酸などの多くの一般的な夾雑物の影響を受けません。しかしながら、SDS(終濃度 >0.01%)、Tween® 20、および Triton® X-100 などの界面活性剤の使用はお薦めしません。本アッセイの最適な濃度範囲は、アッセイチューブ内で1.25～25μg/mL(0.25～5μg)(アッセイチューブで希釈する前のストックサンプル濃度は 12.5～5 mg/mL)です。シンプルなキットフォーマットを採用しているため、簡単かつ迅速にご使用いただけます。
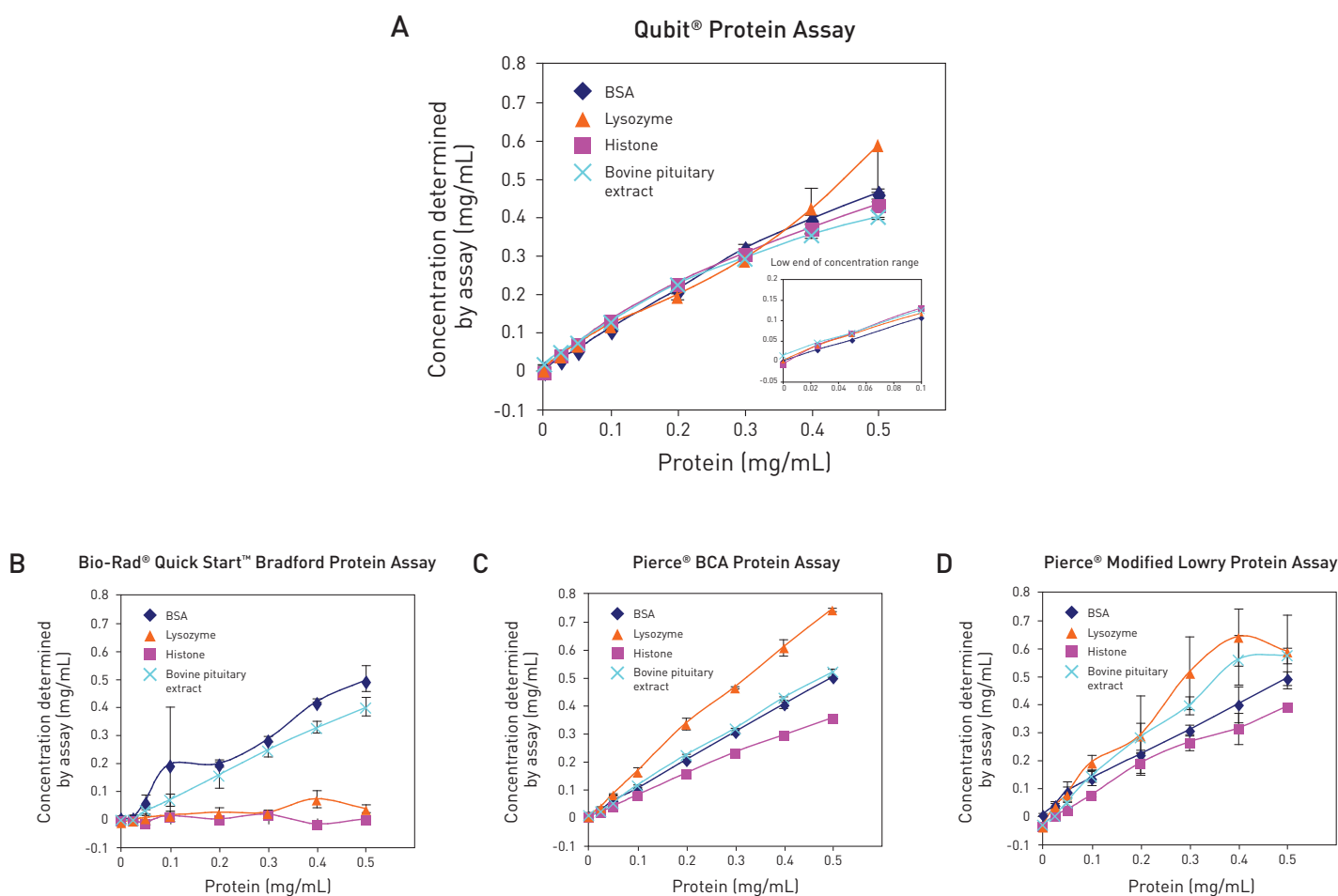
図2. Qubit® Fluorometerを使用したQubit® Protein Assayでは、他の3つの一般的なタンパク質アッセイと比較してタンパク質間での測定値の変動が少なく、正確、精密、かつ高感度な測定結果が得られた。(A～D) すべてのアッセイにおいて各タンパク質はいずれも同じロットのものを使用し、アッセイは製造元のプロトコールに従い3サンプルずつ解析した。Qubit® Protein Assay Kitに含まれているBSAを標準タンパク質として用いた。データをグラフ化し、試験した全濃度範囲におけるタンパク質の種類による測定値差を示した。Aの挿入図は下限濃度域のタンパク質測定値の拡大図であり、Qubit® Fluorometerを使用したQubit® Protein Assayが高感度であることが示された。

参考文献

1. Bradford MM (1976) Anal Biochem 72:248–254.
2. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. (1985) Anal Biochem 150:76–85.
3. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. (1951) J Biol Chem 193:265–275.8.

Qubit® dsDNA アッセイにおける一本鎖 DNA の影響

当社は、二本鎖 DNA（dsDNA）の定量用に、Qubit® Fluorometer を使用した 2 つのアッセイ、Qubit® dsDNA HS (for High Sensitivity) Assay（製品番号 Q32851）および Qubit® dsDNA BR (for Broad Range) Assay（製品番号 Q32850）を提供しています。これらのアッセイの優位点の 1 つは dsDNA に対する特異性です。 本試験は、サンプルに短鎖または長鎖の一本鎖 DNA（ssDNA）が含まれている場合に Qubit® dsDNA 定量アッセイによって正確に dsDNA 濃度を測定できるかどうかを評価するために実施しました。

概要

Qubit® dsDNA HS Assay Kit は、1 ～ 500 ng/mL の測定範囲の高純度 dsDNA サンプルを使用した試験において、高い正確度および密度を示しました。同様に、Qubit® dsDNA BR Assay Kit は、0.01 ～ 5μg/mL の測定範囲の高純度 dsDNA サンプルを使用した試験において、高い正確度および精度を示しました。本試験では、大部分の測定範囲でわずか 2 ～ 10％の高純度 ssDNA が検出されました。同様の試験において、dsDNA と同量の ssDNA を添加したサンプルでは、dsDNA 単独の試験で得られた濃度から概ね 10％以内の測定値が得られました。

実験方法

長鎖と短鎖の 2 タイプの ssDNA の影響について、Qubit® の両アッセイで試験しました。具体的には、18-mer のオリゴヌクレオチド（M13 シーケンシングプライマー、配列：5' TGTAAAACGACGGCCAGT 3'）および M13mp18 ファージ由来のウイルス ssDNA（7,249 bases, New England Biolabs, 製品番号 N4040S）を使用しました。これらの ssDNA をλ DNA(Invitrogen™ λ DNA, 製品番号 25250010）に対して単独または併用で、Qubit® dsDNA BR Assay Kit（製品番号 Q32850）および Qubit® dsDNA HS Assay Kit（製品番号 Q32851）を用いて解析しました。

結果

ssDNA 単独でのアッセイ

各タイプの DNA（オリゴ DNA、長鎖 ssDNA、および dsDNA）についてそれぞれ各アッセイで解析しました。オリゴヌクレオチドおよび長鎖 ssDNA はいずれも、Qubit® dsDNA HS/BR Assay の両アッセイで、実際の ssDNA 濃度の 10％以下の値として検出されました（製造元より報告されている濃度をもとに算出）（図 1A および 1B.）。これらの結果は、Qubit® dsDNA アッセイが ssDNA よりも dsDNA に対して高選択的であることを示しています。
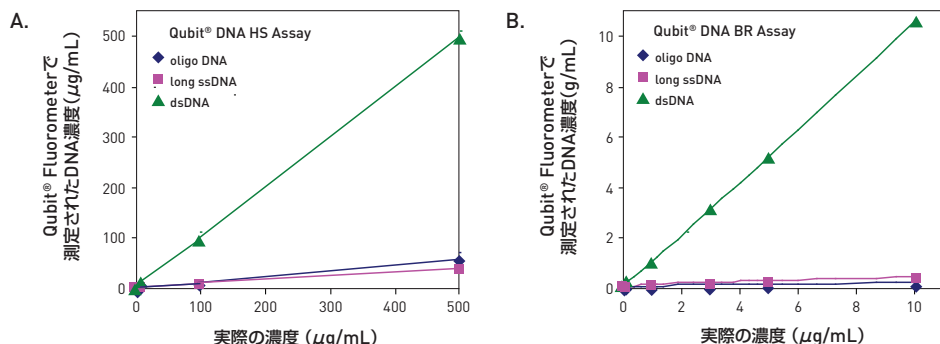
図1. Qubit® dsDNA HS（A）およびBR（B）Assay Kitによる一本鎖DNAの検出
キットのプロトコールに従って、長鎖ssDNA（四角）、オリゴDNA（菱形）、またはλDNA（三角）のサンプルを各2つずつ、 Qubit® dsDNA HS Assayでは0.5～500 ng/mL、Qubit® dsDNA BR Assayでは0.01～10μg/mLのアッセイチューブ内濃度になるように添加した。すべてのストックサンプル（アッセイチューブで希釈する前のサンプル）は10 mM Tris, 1 mM EDTA（pH 7.5）bufferで希釈した。

Qubit® dsDNA HS Assay Kit による dsDNA 定量アッセイにおける ssDNA の影響

ssDNA 存在下の Qubit® dsDNA Assay において、ssDNA が dsDNA の定量に影響するかどうかについても試験を行いました。 Qubit® dsDNA HS Assay において、オリゴ DNA と dsDNA の濃度比が 1:1 では、試験したすべての濃度のサンプルで dsDNA 濃度はオリゴ DNA を含まないサンプルの測定値の 11%以内の値として検出されました(図 2)。長鎖 ssDNA と dsDNA の濃度比が 1:1 の低い DNA 濃度では、dsDNA 濃度は ssDNA を含まないサンプルの測定値の 8%以内の値として検出されました(図 2A および 2B)。しかしながら、長鎖 ssDNA と dsDNA の濃度比が 1:1 の高い核酸濃度では、dsDNA 濃度は ssDNA を含まないサンプルの測定値よりも 21%低い値として検出されました(図 2C)。このため、サンプルに少なくとも 400 ng/mL の dsDNA が含まれ、ssDNA が混入している可能性がある場合は、Qubit® dsDNA BR Assay を使用することをお薦めします。

A.

B.

C.
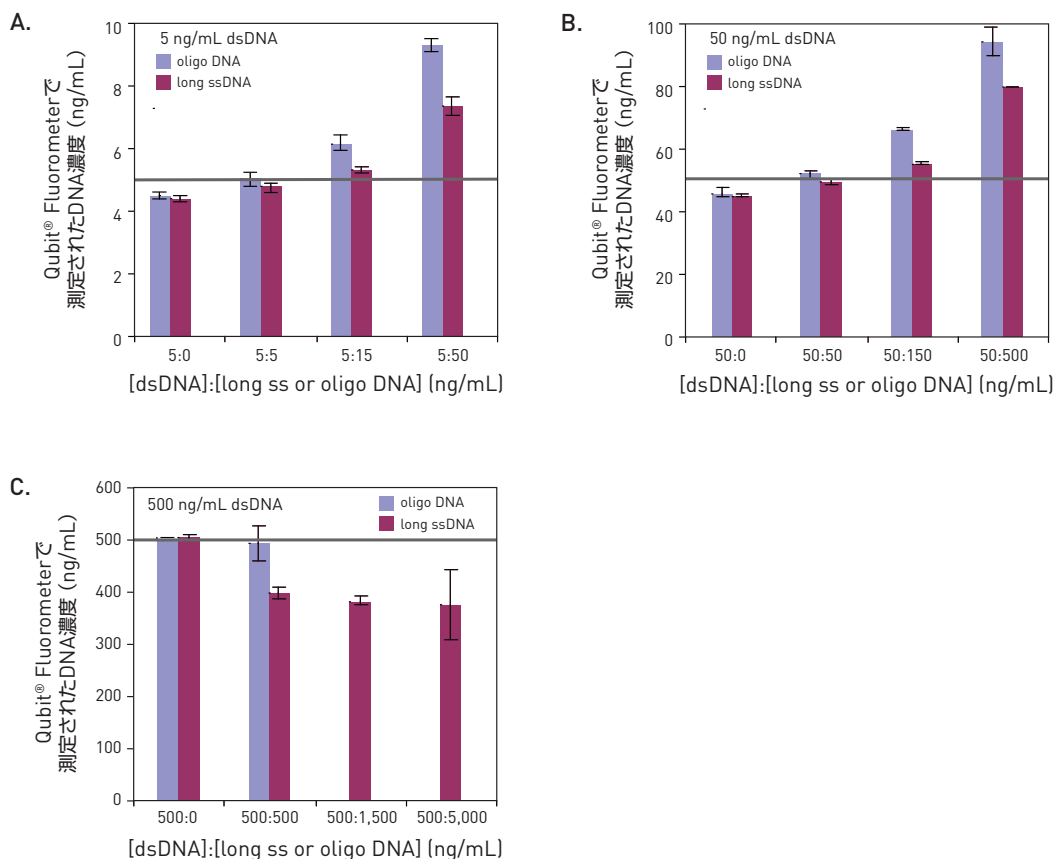
図2. Qubit® Fluorometerを使用したQubit® dsDNA HS Assayによる二本鎖DNA定量におけるオリゴDNAまたは長鎖ssDNAの影響
dsDNA濃度の0、1X、3X、または10X希釈濃度のオリゴDNAまたはssDNAをdsDNAと混合したサンプルを各2つずつ、アッセイチューブ内で5 ng/mL (A)、50 ng/mL (B)、および500 ng/mL (C) のdsDNA濃度になるようにQubit® dsDNA HS Assayに添加した。すべてのストックサンプル(アッセイチューブで希釈する前のサンプル)は10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7.5) bufferで希釈した。横線は実際のdsDNAの濃度を示す。

Qubit® dsDNA BR Assay Kit による dsDNA 定量アッセイにおける ssDNA の影響

Qubit® dsDNA BR Assay において、オリゴ DNA と dsDNA の濃度比が 1:1 では、試験したすべての濃度のサンプルで dsDNA 濃度はオリゴ DNA を含まないサンプルの測定値の 3%以内の値として検出されました。また、長鎖 ssDNA と dsDNA の濃度比が 1:1 では、試験したすべての濃度のサンプルで dsDNA 濃度はオリゴ DNA を含まないサンプルの測定値の 11%以内の値として検出されました（図 3)。
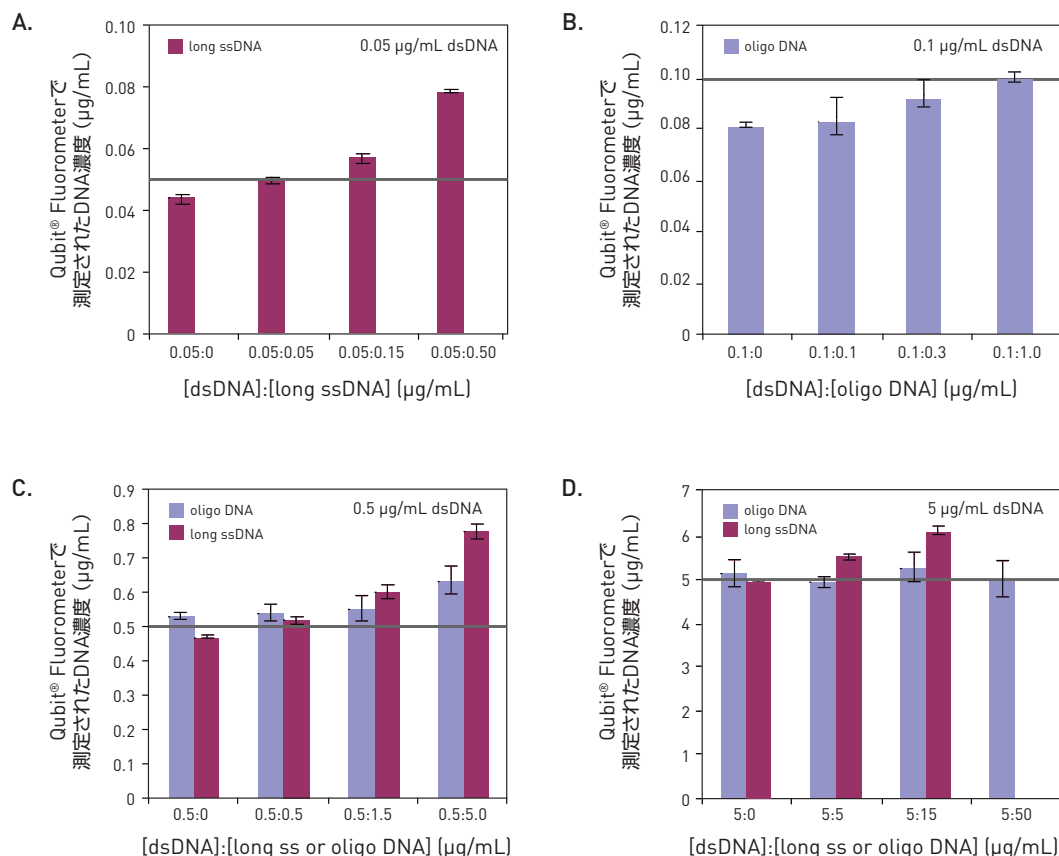
図3. Qubit® Fluorometerを使用したQubit® dsDNA BR Assayによる二本鎖DNA定量におけるオリゴDNAまたは長鎖ssDNAの影響
dsDNA濃度の0、1X、3X、または10X希釈濃度のオリゴDNAまたはssDNAをdsDNAと混合したサンプルを各2つずつ、アッセイチューブ内で0.05µg/mL（A）、0.1µg/mL（B）、0.5µg/mL（C）、および0.5µg/mL（D）のdsDNA濃度になるようにQubit® dsDNA BR Assayのアッセイに添加した。すべてのストックサンプル（アッセイチューブで希釈する前のサンプル）は10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7.5) bufferで希釈した。横線は実際のdsDNAの濃度を示す。

結論

同量のssDNAが含まれるサンプルのdsDNA濃度の定量では、dsDNA単独サンプルの測定値から概ね10%以内の値としてdsDNA濃度が検出されました。例えば、0.50µg/mLのdsDNAに0.50µg/mLの長鎖ssDNAが混合されたサンプルでは、dsDNA BR AssayでdsDNAは0.52µg/mLと測定されました。しかしながら、dsDNA HS Assayによる測定上限濃度のdsDNAの定量では、同量の長鎖ssDNAが含まれるサンプルのdsDNA濃度は、実際のdsDNA濃度のわずか80%の値として測定されました。このため、400 ng/mLを超えるdsDNA濃度（アッセイチューブ）で長鎖ssDNAの混入の可能性がある場合はdsDNA BR Assayを使用することをお薦めします。オリゴDNAまたは長鎖ssDNAがdsDNAの3倍以上の濃度で含まれる場合は、いずれのアッセイでも、大部分でdsDNA濃度は実際のdsDNA濃度よりも10%以上高く測定されることが示されました。結果を表1にまとめました。

表1. Qubit® **dsDNA HS/BR AssayにおけるssDNA混入の影響**

アッセイにおけるssDNAの許容混入量*		
	Qubit® dsDNA HS Assay	Qubit® dsDNA BR Assay
18-mer オリゴssDNA	1:1 ssDNA:dsDNA、全濃度域で影響なし	1:1 ssDNA:dsDNA、全濃度域で影響なし
M13mp18 ファージ（長鎖）ssDNA	1:1 ssDNA:dsDNAで、最大400 ng/mL†まで	1:1 ssDNA:dsDNA、全濃度域で影響なし

*ssDNAの許容混入量が含まれるサンプルのアッセイにおけるdsDNA濃度測定値の変動は11%未満。

† dsDNA濃度（アッセイチューブ）が400 ng/mL以上で、長鎖ssDNAの混入の可能性がある場合はdsDNA BR Assayはお薦めできません。dsDNA HS Assayの使用をお薦めします。

Ordering information

製品名	製品番号	価格
Qubit® 3.0 Fluorometer	Q33216	¥195,000
Qubit® 3.0 Quantitation Starter Kit ・ Qubit® Fluorometer ：1台 ・ dsDNA HS assay （100 assays）：1個 ・ dsDNA BR assay （100 assays）：1個 ・ RNA HS assay （100 assays）：1個 ・ protein assay （100 assays）：1個 ・ Qubit® assay tubes （500）：1セット	Q33217	¥215,000
Qubit® 3.0 NGS Starter Kit ・ Qubit® Fluorometer ：1台 ・ dsDNA HS assay （500 assays）：1個 ・ Qubit® assay tubes （500）：1セット	Q33218	¥210,000

関連製品

製品名	サイズ	製品番号	価格
Qubit® dsDNA BR Assay Kit , ‘2–1000 ng’	100 assays	Q32850	¥10,500
Qubit® dsDNA BR Assay Kit , ‘2–1000 ng’	500 assays	Q32853	¥35,000
Qubit® dsDNA HS Assay Kit , ‘0.2–100 ng’	100 assays	Q32851	¥10,500
Qubit® dsDNA HS Assay Kit , ‘0.2–100 ng’	500 assays	Q32854	¥35,000
Qubit® ssDNA Assay Kit , ‘1–200 ng’	100 assays	Q10212	¥10,500
Qubit® RNA BR Assay Kit , ‘20–1000 ng’	100 assays	Q10210	¥10,500
Qubit® RNA BR Assay Kit , ‘20–1000 ng’	500 assays	Q10211	¥35,000
Qubit® RNA HS Assay Kit , ‘5–100 ng’	100 assays	Q32852	¥10,500
Qubit® RNA HS Assay Kit , ‘5–100 ng’	500 assays	Q32855	¥35,000
Qubit® microRNA Assay Kit, ‘1-100ng’	100 assays	Q32880	¥10,500
Qubit® microRNA Assay Kit, ‘1-100ng’	500 assays	Q32881	¥35,000
Qubit® Protein Assay Kit , ‘0.25–5 μg’	100 assays	Q33211	¥10,500
Qubit® Protein Assay Kit , ‘0.25–5 μg’	500 assays	Q33212	¥35,000
Qubit® Assay Tubes	500 tubes	Q32856	¥6,500

Qubit® Fluorometerの詳細は **www.lifetechnologies.com/qubit** をご覧ください。

最新の価格および在庫数は、弊社ホームページ右上の“製品価格と在庫の検索”でご確認いただけます。

研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。
記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。
標準販売条件はこちらをご覧ください。www.lifetechnologies.com/TC

Printed in Japan. IVN079-A1411OB

販売店

サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023　東京都港区芝浦 4-2-8

テクニカルサポート　0120-477-392　jptech@lifetech.com
オーダーサポート　TEL：03-6832-6980　FAX：03-6832-9584
営　業　部　TEL：03-6832-9300　FAX：03-6832-9580

facebook.com/LifeTechnologiesJapan　@LifetechJPN

www.lifetechnologies.com

life technologies

A Thermo Fisher Scientific Brand